

ВЗАИМОСВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМА ASN680SER ГЕНА FSHR И ДИНАМИКИ ОВАРИАЛЬНОГО РЕЗЕРВА

Одесский национальный медицинский университет

Реферат. Т. Н. Адамовская, Ю. Ю. Петровский **ВЗАИМОСВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМА ASN680SER ГЕНА FSHR И ДИНАМИКИ ОВАРИАЛЬНОГО РЕЗЕРВА.** Целью представленного исследования было выявление потенциальной связи между полиморфизмом гена рецептора к фолликулостимулирующему гормону (ФСГ) и динамикой овариального резерва. **Материалы и методы:** Для достижения поставленной цели у 30 женщин репродуктивного возраста определяли уровень сывороточного антимюллерового гормона (АМГ) и взяты букальные соскобы. **Результаты.** Выявлена взаимосвязь между отклонением уровня АМГ от данных, полученных при моделировании нормальных значений в популяции с видом полиморфизма Asn680Ser гена FSHR. Наиболее выраженные отличия были между группами с наличием мутации (AA и Aa) и её отсутствием (aa), в то время как между группами женщин с гомозиготной (AA) и гетерозиготной (Aa) мутацией это различие отсутствовало. При изучении возрастной динамики АМГ в зависимости от полиморфизма Asn680Ser гена FSHR были выявлены более высокие значения АМГ. **Выводы.** Выявлена взаимосвязь между отклонением уровня сывороточного АМГ от предложенной ранее модели возрастной динамики АМГ и полиморфизмом Asn680Ser гена FSHR. Необходимо дальнейшее изучение полученной связи на большей популяции.

Ключевые слова: Asn680Ser, FSHR, антимюллеров гормон, овариальный резерв.

Реферат. Т. М. Адамовська, Ю. Ю. Петровський **ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК ПОЛІМОРФІЗМУ ASN680SER ГЕНА FSHR І ДИНАМІКИ ОВАРІАЛЬНОГО РЕЗЕРВУ.** Метою представленого дослідження було виявлення потенційного зв'язку між поліморфізмом гена рецептора до фолікулостимулюючого гормону (ФСГ) і динамікою оваріального резерву. **Матеріали і методи.** Для досягнення поставленої мети у 30 жінок репродуктивного віку було виконано визначення рівня сироваткового антимюлерівського гормону (АМГ) і взято букальний зскрібок. **Результати.** Виявлений взаємозв'язок між відхиленням рівня АМГ від даних отриманих при моделюванні нормальних значень в популяції з видом поліморфізму Asn680Ser гена FSHR. Найбільш виражені відмінності були між групами з наявністю мутації (AA і Aa) і її відсутністю (aa), тоді як між груп жінок з гомозиготною (AA) і гетерозиготною (Aa) мутацією ця відмінність була відсутня. При вивченні вікової динаміки АМГ залежно від поліморфізму Asn680Ser гена FSHR були виявлені більш високі значення АМГ.

Висновки. Виявлений взаємозв'язок між відхиленням рівня сироваткового АМГ від запропонованої раніше моделі вікової динаміки АМГ і поліморфізмом Asn680Ser гена FSHR. Потрібне подальше вивчення отриманого зв'язку на більшій популяції.

Ключові слова: Asn680Ser, FSHR, антимюлерів гормон, оваріальний резерв.

Summary. N. N. Adamovskaya, Yu. Yu. Petrovsky **RELATIONSHIP OF FSHR GENE POLYMORPHISM ASN680SER AND DYNAMICS OF OVARIAN RESERVE.** The aim of this study was to determine the potential association between Asn680Ser polymorphism of follicle stimulating hormone receptor (FSHR) gene and the dynamics of ovarian reserve. **Materials and methods.** The level of serum anti-Müllerian hormone (AMH) and buccal swabs were taken from 30 women of reproductive age. **Results.** The correlation between the deviation of AMH levels from the age normal values in a population with a type of Asn680Ser polymorphism of FSHR gene. The most significant differences were between the groups with the presence of a mutation (AA and Aa) and its absence (aa), while difference between the groups of women with homozygous (AA) and heterozygous (Aa) mutation was absent. Higher values of AMH were found while studying the age dynamics among the groups with different types of FSHR gene polymorphism Asn680Ser. **Conclusion.** The relation between the deviation of serum AMH from the validated model values and gene polymorphism Asn680Ser FSHR was revealed. Further study on larger population is needed to confirm presented findings.

Key words: Asn680Ser, FSHR, ovarian reserve, antimullerian hormone,

Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) – гликопротеид, состоящий из двух субъединиц α и β , α субъединица состоит из 92 аминокислот и идентична у лютеинизирующего гормона (ЛГ), хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) и тиреотропного гормона (ТТГ). β -субъединица состоит из 111 специфична для ФСГ и определяет его биологическое действие и отвечает за взаимодействие с рецептором ФСГ. Кроме белковой части в состав гликопротеида также входят фруктоза, галлактоза, галактозамина, глюкозамина и салициловая кислота, последняя крайне важна для биологического распада ФСГ. Гены, кодирующие α и β субъединицы ФСГ располагаются в разных хромосомах (6p21.1-23 и 11p13 соответственно). Экспрессия β субъединицы гена происходит в клетках гипофиза и контролируется гонадотропин релизинг гормоном ГнРГ, ингибином и активином.

Рецептор к ФСГ (FSHR) представляет из себя трансмембранный рецептор, состоящий из 695 нуклеотидов, который взаимодействует с ФСГ. Рецептор необходим для реализации функции ФСГ. Чаще всего

обнаруживается в яичниках, яичках и матке. Ген FSHR располагается в 2-й хромосоме и состоит из примерно 2,080 нуклеотидов [1]. Описано 4013 полиморфизма этого гена [2]. Среди нарушений связанных с нарушением структуры гена описаны такие заболевания, как абсолютное бесплодие, дисгенезия гонад, преждевременное угасание функции яичников, синдром гиперстимуляции яичников, первичная аменорея, синдром резистентных яичников, первичная яичниковая недостаточность, мукозная кистаденома яичников, гранулёзоклеточная опухоль. Вышеупомянутые полиморфизмы могут вести как к повышению, так и к понижению чувствительности рецептора к ФСГ вплоть до полной нечувствительности.

В литературе посвящённой гену FSHR наиболее часто уделяется внимание однонуклеотидным полиморфизмам Thr307Ala и Asn680Ser. Выявлена взаимосвязь между встречаемостью этих полиморфизмов и муцинозными типами рака яичников [3]. Мутация 680Ser ведёт к снижению активности рецепторов ФСГ, вследствие чего у женщин зачастую наблюдается сниженный уровень эстрадиола, прогестерона и ингибина А в крови, ранний рост и повышенный уровень ФСГ в лютеиновой фазе менструального цикла, что в свою очередь ведёт к удлинению менструального цикла [4]. Полиморфизм данного гена, в частности, определяет ответ на стимуляцию яичников препаратами ФСГ для осуществления ЭКО.

Мутация Asn680Ser (A1961G; rs6166; замена нуклеотида аланина на гуанин, приводящая к замене аминокислоты аспарагина на серин в белке) наследуется по аутосомно-доминантному типу и встречается у мужчин и женщин с одинаковой частотой.

Целью представленного исследования было выявление потенциальной связи между полиморфизмом гена - рецептора к ФСГ и динамикой овариального резерва.

Материалы и методы. Для достижения поставленной цели у 30 женщин репродуктивного возраста было выполнено определение уровня сывороточного АМГ и взяты букальные соскобы. В исследование включались женщины, у которых в ходе рутинного гинекологического обследования (опрос, осмотр на гинекологическом кресле, УЗИ, урогенитальные мазки, цитоморфологическое исследование соскоба из канала шейки матки) не было выявлено гинекологической патологии и проблем с фертильностью. Все женщины, участвовавшие в исследовании подписали информированное согласие на забор у них биологического материала. Исследование прошло экспертизу в комиссии по биоэтике при Одесском национальном медицинском университете (протокол № 21 Б от 25.05.2012г.).

Для определения АМГ был использован иммуноферментный анализ (ИФА).

Наличие мутации Asn680Ser гена FSHR оценивали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

ПЦР проводили на амплификаторе BIO-RAD (США) и экспериментально подбирали необходимую программу смены температур и длительности каждого шага реакции. ПЦР амплификацию гена FSHR гена в 20 мкл буферного раствора (фирма «Fermentas») и 100 нм каждого олигонуклеотидного праймера F-5'-TTTGTGGTCATCTGTGGCTGC-3', R 5'-CAAAGGCAAGGACTGAATTATCATTT-3', 100-150нг ДНК. Начальная денатурация - 95°C в течение 10мин. ПЦР в течение 35 циклов: денатурация при 95°C в течение 30сек, отжиг при температуре 60°C в течение 30сек и элонгация при 72°C в течение 30сек и окончательная элонгация 3 минуты при 72°C.

Для идентификации мутации Asn680Ser гена FSHR проводили рестрикцию продуктов амплификации с помощью эндонуклеазы BseN1(BsrI) (фирма «Fermentas») Для этого 10 мкл амплификата смешивали с 10 мкл рестрикционной смеси. Образец рестрицировали при оптимальной для данного фермента температуре -650в течении 2-3часов.

В норме продукт амплификации составляет 520п.о. При мутации в образце возникает дополнительный сайт рестрикции и на электрофореграмме при гомозиготе по мутации -2 фрагмента 413 п.о., 107 п.о. Гетерозиготы представлены 3-мя фрагментами-520 п.о., 413 п.о. и 107 п.о.

Разделение продуктов амплификации проводили в горизонтальном 2% агарозном геле, приготовленном на однократном трис-боратном буфере (1xTBE). Маркер молекулярного веса- ДНК pUC19: MspI.

Агарозный гель красили бромистым этидием и визуализировали в проходящем ультрафиолетовом свете.

Для оценки результатов было использовано программное обеспечение R (язык и среда для статистических расчётов) [5].

Результаты. При анализе из 30 женщин у 5 в результате предварительного спектрофотометрического анализа было выявлена недостаточная концентрация ДНК в образцах полученных из букального соскоба. Два образца сыворотки были отбракованы вследствие нарушения условий доставки и хранения. Остальные 23 женщины прошли обследование в полном объёме.

Возраст женщин составил в среднем 28,87±1,47 года (19-37). Была выявлена сильная корреляция ($r=-0.78$) уровня сывороточного АМГ с возрастом больных и моделью предложенной Wallace и Kelsey [6] и подтверждённой нами ранее на украинской популяции [7] ($r=0.82$).

Среди обследованных женщин у 4 (17,4%) был выявлена гомозиготная мутация Asn680Ser гена FSHR, у 8 (34,7%) – гетерозиготная а у 11 (47,8%) – мутация не была обнаружена. Значимых различий в возрасте (ANOVA: $F(2,20)=0.007$; $p=0.993$; см. Рис. 1) и уровне АМГ (ANOVA: $F(2,20)=0.711$; $p=0.503$; $\eta^2=0.082$; см. Рис. 2) между группами женщин с различным генотипом выявлено не было.

При оценке распределения генотипов по полиморфизму Asn680Ser гена FSHR в популяции нами получено отсутствие значимых различий между ожидаемым распределением (расчитаному по закону Харди-Вайнберга) и фактически полученным ($\chi^2 = 1,25$; $p > 0.05$). Таким образом, изучаемая популяция была равновесной и сбалансированной по числу гетерозиготных и гомозиготных генотипов.

В то же время нами была выявлена взаимосвязь между отклонением уровня АМГ от данных полученных при моделировании нормальных значений в популяции (т.е. нормализованными по возрасту) [7] с видом

полиморфизма Asn680Ser гена FSHR (ANOVA: $F(2,20)=1,967$; $p=0,166$; $\eta^2=0,16$; см. Рис. 3). При Post-hoc анализе с использованием теста Tukey HSD (см. Таблицу 2) наиболее выраженные отличия были между группами с наличием мутации (AA и Aa) и её отсутствием (aa), в то время как между групп женщин с гомозиготным (AA) и гетерозиготным (Aa) по данной мутации это различие отсутствовало.

При изучении возрастной динамики АМГ в зависимости от полиморфизма Asn680Ser гена FSHR были выявлены более высокие значения АМГ у пациенток с гомозиготным генотипом по нормальному “wild” аллелю (a) (Рис. 3).

Таблица 1.

Ожидаемое и фактическое распределение мутации FSHR Asn680Ser в популяции обследованных женщин

FSHR Asn680Ser	Ожидаемое	Фактическая
Aa	2,78 (12,1%)	4(17,4%)
Aa	10,43(45,3%)	8 (34,8%)
AA	9,78(42,5%)	11(47,8%)

Таблица 2.

Различия в отклонении АМГ от нормальных значений между группами женщин с различным генотипом (результаты Post-hoc теста Tukey HSD)

	Разница	Минимум	Максимум	P
Aa-aa	2.34894877	-0.9976087	5.695506	0.2030962
AA-aa	2.36285671	-0.8279607	5.553674	0.1723162
AA-Aa	0.01390794	-2.5254161	2.553232	0.9998941

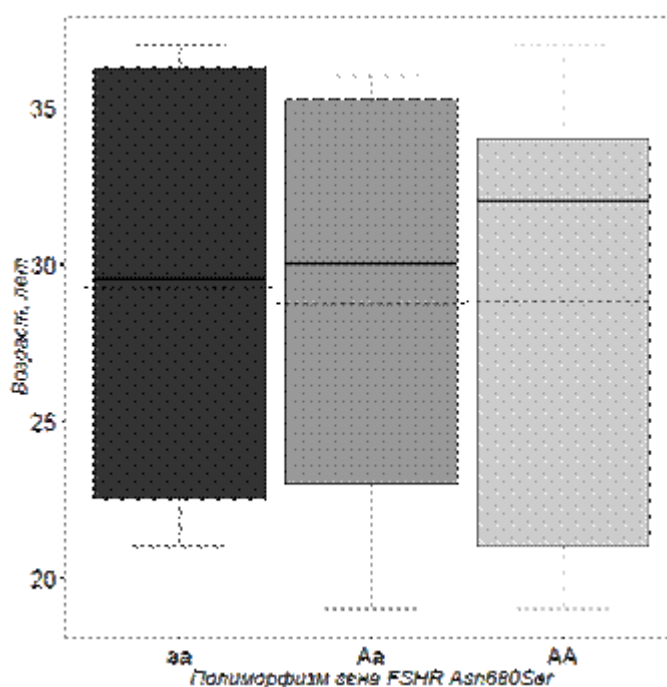


Рис.1. Возрастная структура обследованных пациенток в зависимости от вида полиморфизма Asn680Ser гена FSHR

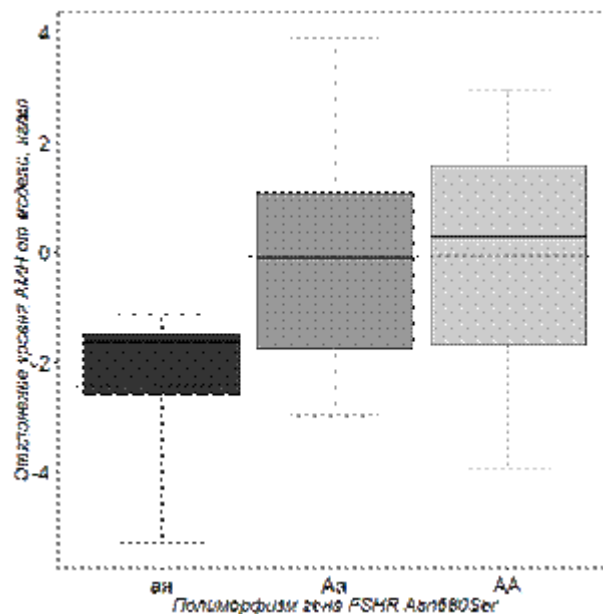


Рис. 2. Отклонение уровня сывороточного АМГ от модели (нормализация по возрасту) в зависимости от вида полиморфизма Asn680Ser гена FSHR

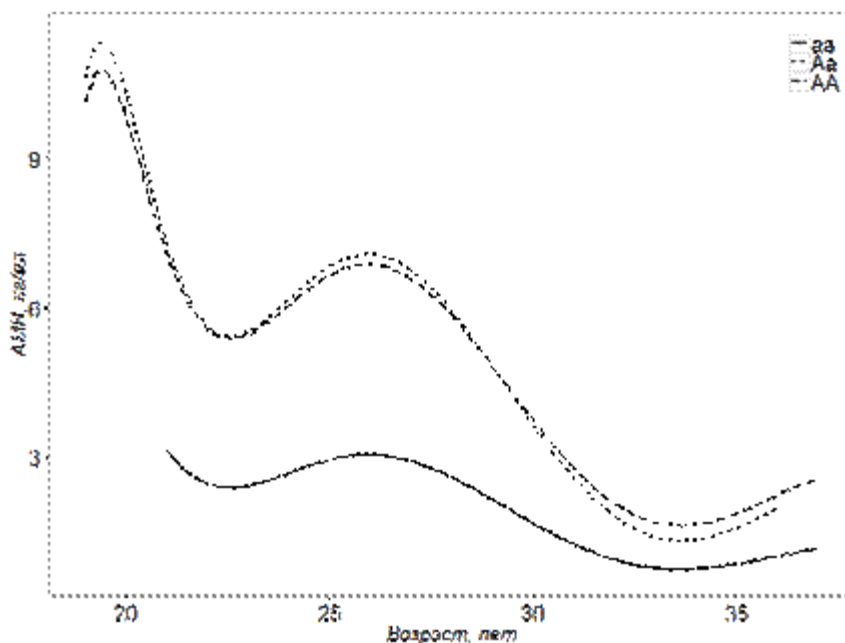


Рис. 3. Возрастная динамика различных вариантов полиморфизма Asn680Ser гена FSHR.

Обсуждение полученных результатов. Отсутствие взаимосвязи между абсолютными значениями АМГ и видом полиморфизма Asn680Ser гена FSHR в полученных данных может быть объяснено сильной вариабельностью первого из них в популяции. Подобные данные были получены Binder и его коллегами [8].

Сниженная чувствительность тканевых рецепторов к ФСГ ведёт с одной стороны к удлинению менструального цикла за счёт лютеиновой фазы [4] и снижению числа примордиальных фолликулов, выходящих из пула под воздействием ФСГ, а следовательно к более медленному истощению овариального резерва. Таким образом, женщины с наличием полиморфизма Asn680Ser гена FSHR с одной стороны могут иметь проблемы с зачатием, но с другой стороны – относительно большую длительность репродуктивного периода.

Нельзя исключить, что более высокие значения показателей овариального резерва у таких женщин могут быть связаны с тем, что та часть пула примордиальных фолликулов, который остается в яичниках на конкретный момент времени, является достаточно многочисленной прежде всего за счет преобладания незрелых преантральных и антральных фолликулов, и, соответственно, репродуктивный потенциал каждого ооцита у таких женщин существенно ограничивается.

Следует отметить, что синтез АМГ происходит преимущественно в клетках гранулезы, что дает основания некоторым исследователям утверждать, что уровень АМГ на самом деле не отражает реальный овариальный резерв, и рекомендовать определять одновременно с АМГ другие показатели (уровень ФСГ, ингибина В, базальной секреции эстрадиола, ультрасонографическая картина в динамике).

В настоящее исследование не были включены женщины с гинекологической патологией, в связи с чем оценить справедливость полученной модели в условиях нарушений овариально-менструального цикла не представляется возможным. Тем не менее, при комплексной оценке овариального резерва изучение отклонений уровня АМГ от расчетного, согласно выявленных закономерностей представляется перспективным.

По нашему мнению, наряду с оценкой общеклинических показателей необходимо оценивать молекулярно-генетические маркеры состояния овариального резерва, к которым, в частности, можно отнести наличие мутантных аллелей функционального полиморфизма Asn680Ser гена *FSHR*. Наличие аллеля А (S⁶⁸⁰) следует рассматривать как высокочувствительный маркер риска снижения фертильности у женщин репродуктивного возраста.

Выводы. Нами выявлена взаимосвязь между отклонением уровня сывороточного АМГ от предложенной ранее модели возрастной динамики АМГ и полиморфизмом Asn680Ser гена *FSHR*. Необходимо дальнейшее изучение полученной связи на большей популяции.

Литература:

1. Simoni M. The Follicle-Stimulating Hormone Receptor: Biochemistry, Molecular Biology, Physiology, and Pathophysiology // *Endocrine Reviews*. 1997. Vol. 18, № 6. P. 739–773.
2. *FSHR Gene* - GeneCards | *FSHR Protein* | *FSHR Antibody* [Online]. URL: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FSHR> (accessed: 18.02.2013).
3. Yang C.Q. et al. Single nucleotide polymorphisms of follicle-stimulating hormone receptor are associated with ovarian cancer susceptibility. // *Carcinogenesis*. 2006. Vol. 27, № 7. P. 1502–1506.
4. Greb R.R. et al. A common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the human follicle stimulating hormone receptor is a major determinant of length and hormonal dynamics of the menstrual cycle. // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005. Vol. 90, № 8. P. 4866–4872.
5. R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing [Online]. Vienna, Austria, 2009. URL: <http://www.r-project.org>.
6. Wallace W.H.B., Kelsey T.W. Human ovarian reserve from conception to the menopause. // *PloS one*. 2010. Vol. 5, № 1. P. e8772.
7. Адамовська Т.М. Оцінка овариального резерву шляхом визначення рівня секреції антимюлерівського гормону // *Актуальні питання педіатрії, акушерства та гінекології*. 2012. № 1(9). P. 89–90.
8. Binder H. et al. Assessment of *FSHR* variants and antimüllerian hormone in infertility patients with a reduced ovarian response to gonadotropin stimulation. // *Fertility and sterility*. 2012. Vol. 97, № 5. P. 1169–75.e1.

Работа поступила в редакцию 18.03.2013 года.

Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования